

1/5/1

6

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013643241

WPI Acc No: 2001-127449/200114

XRAM Acc No: C01-037482

XRXP Acc No: N01-094062

Prediabetic state detection method involves measuring increase in D-kilo inositol quantity in urine of diseased subject and healthy subject

Patent Assignee: KAWAMORI R (KAWA-I); KYOWA HAKKO KOGYO KK (KYOW )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2000298131	A	20001024	JP 99106979	A	19990414	200114 B

Priority Applications (No Type Date): JP 99106979 A 19990414

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	--------	----------	--------------

JP 2000298131	A	5	G01N-033/66
---------------	---	---	-------------

Abstract (Basic): JP 2000298131 A

NOVELTY – The increase in quantity of D-kilo inositol in urine of subject is measured after a fixed time passage after administering sugar. The quantity of D-kilo inositol in the urine of healthy subject is determined similarly. Both the assayed values are compared to detect the prediabetic state of the subject.

USE – For diagnosis of prediabetic state such as insulin resistance, insulinemia and glucose tolerance insufficiency.

ADVANTAGE – The method is a forecast method of diseases of prediabetic state such as diabetes mellitus, arteriosclerosis, hypertension and polycystic ovary syndrome. By forecasting the disease, prediabetic state can be effectively improve by administering suitable medicinal agents. This method can also evaluate the effect of therapeutic agents such as prediabetic state improving agent.

pp; 5 DwgNo 0/2

Title Terms: STATE; DETECT; METHOD; MEASURE; INCREASE; KILO; INOSITOL; QUANTITY; URINE; DISEASE; SUBJECT; HEALTH; SUBJECT

Derwent Class: B04; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/66

File Segment: CPI; EPI

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-298131

(P2000-298131A)

(43)公開日 平成12年10月24日 (2000.10.24)

(51) Int.Cl.  
G 0 1 N 33/66

識別記号

F I  
G 0 1 N 33/66

テマコード(参考)  
A 2 G 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数12 O.L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平11-106979

(22)出願日 平成11年4月14日 (1999.4.14)

(71)出願人 599052152

河盛 隆造

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学  
医学部内科学教室代謝内分泌学講座内

(71)出願人 000001029

協和醸酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 河盛 隆造

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学  
医学部内科学教室代謝内分泌学講座内

(74)代理人 100106574

弁理士 岩橋 和幸

Fターム(参考) 20045 AA16 AA25 CB03 DA30 JA06

(54)【発明の名称】 前糖尿病状態の検出方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 非侵襲的に前糖尿病状態を簡便に検出する方法を提供する。

【解決手段】 糖を投与後の一定時間経過後に被験者から採取された尿中のD-キロイノシトールの量または増加率を定量し、あらかじめ定量された健常人の尿中のD-キロイノシトールの量または増加率に基づいて設定した基準値との比較により前糖尿病状態を検出する。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖投与後一定時間経過後の被験者の尿中のD-キロイノシトールの量または増加率と、同様にして定量された健常人の尿中のD-キロイノシトールの量または増加率との比較により前糖尿病状態を検出する方法。

【請求項2】 尿が、糖投与後0～5時間の間で30分～2時間置きに採取された尿である請求項1記載の方法。

【請求項3】 尿が、糖投与後1～3時間の間の任意の1時間分として採取された尿である請求項1記載の方法。

【請求項4】 前糖尿病状態がインスリン抵抗性である請求項1記載の方法。

【請求項5】 前糖尿病状態が高インスリン血症である請求項1記載の方法。

【請求項6】 前糖尿病状態が耐糖能不全である請求項1記載の方法。

【請求項7】 前糖尿病状態がインスリン抵抗性であって、尿が糖投与後1～3時間の間の任意の1時間分として採取されたものである請求項1記載の方法。

【請求項8】 前糖尿病状態が高インスリン血症であって、尿が糖投与後1～3時間の間の任意の1時間分として採取されたものである請求項1記載の方法。

【請求項9】 前糖尿病状態が耐糖能不全であって、尿が糖投与後1～3時間の間の任意の1時間分として採取されたものである請求項1記載の方法。

【請求項10】 尿中クレアチニン1mgに対しD-キロイノシトールが3.0μgを超える被験者を前糖尿病状態として検出する請求項1の方法。

【請求項11】 請求項1記載の検出方法による結果に基づき、前糖尿病状態を経て発症する疾患を予知する方法。

【請求項12】 疾患が糖尿病、動脈硬化、高血圧または多嚢胞性卵巣症候群である請求項11の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、インスリン抵抗性、高インスリン血症、耐糖能不全等の前糖尿病状態の検出方法に関するものである。また本発明は、これら前糖尿病状態を経て発症する疾患、例えば糖尿病、動脈硬化、高血圧、多嚢胞性卵巣症候群などの疾患の予知法、診断法、さらに、それら疾患を治療するための薬剤である前糖尿病状態改善剤などの薬物評価法を提供する。

## 【0002】

【従来の技術】インスリンは、膵臓のβ細胞から分泌されるホルモンであり、骨格筋、肝臓、脂肪組織に作用して、血糖を下げる作用を有する。インスリン抵抗性とは、インスリンが作用するこれらの組織において、インスリンが有効に作用しにくくなつた状態を意味する。し

2

たがつて、インスリン抵抗性は、糖尿病の原因の一つとなり得る。ただし、インスリン抵抗性が存在しても、それを補う十分量のインスリン分泌能が膵臓にあれば、分泌量が増えることによって、血中のインスリン濃度が高くなり、インスリン抵抗性に打ち勝つて血糖を正常に保つことができることになるので、糖尿病には至らない。これを高インスリン血症と呼ぶ。つまり、インスリン抵抗性が存在することが、直ちに糖尿病ということにはならないが、糖尿病を発症する危険がある前糖尿病状態といえる。また、インスリン抵抗性によって起こる高インスリン血症も前糖尿病状態といえる。さらに、前糖尿病状態の一つの形態として、耐糖能不全という状態がある。耐糖能不全とは、食事などによって血中に糖が流入した際に、血中の糖を骨格筋、肝臓、脂肪組織などの末梢組織に十分取り込むことができずに、血糖値が上昇する状態を言う。

【0003】糖尿病治療の最終的な目標は、糖尿病合併症の発症予防ならびに進展抑制であるが、この目標を達成するためには、できるだけ初期の段階から治療することが重要であるということが、臨床試験によって実証されている [Diabetes Research and Clinical Practice, 28, 103 (1995)など]。さらに、糖尿病を発症する以前、つまり、前糖尿病状態から治療を行なうことも、さらに進んだ予防的治療法として効果があると考えられ、このことを科学的に実証するための臨床試験が進められている [Diabetes Care, 21, 1720 (1998)など]。したがつて、前糖尿病状態を診断することは、糖尿病の予防、さらには、糖尿病合併症の予防を行なう上で、極めて重要である。

【0004】インスリン抵抗性、高インスリン血症、耐糖能不全などの前糖尿病状態は、糖尿病だけではなく、動脈硬化、高血圧、肥満、多嚢胞性卵巣症候群 (Polycystic Ovary Syndrome, PCOS) などの疾患と深く関わっており、特に、動脈硬化や多嚢胞性卵巣症候群の危険因子とされている。したがつて、これら前糖尿病状態の存在を検出することは、これらの疾患の発症予防・早期治療に役立つと考えられる。

【0005】臨床的に現在行われている糖尿病および前糖尿病状態の診断方法は、国によって基準が少しずつ異なるが、空腹時の血糖値測定と75g経口糖負荷試験における糖負荷後1時間および/または2時間の血糖値測定によって行われる。耐糖能不全は、この方法によって診断されている。高インスリン血症の診断方法は、空腹時の血漿中インスリン濃度測定と75g経口糖負荷試験における糖負荷後2時間までの血漿中インスリン濃度測定によって行われる。これら診断のための血糖値測定および血漿中インスリン濃度の測定は、いずれの場合も血液を複数回採取する必要があるため、侵襲的な方法であり、被験者に苦痛を与える。また、インスリン抵抗性を臨床的に簡便に測定する方法は、現在確立されておら

ず、高インスリン血症と同様に、空腹時の血漿中インスリン濃度測定と75g経口糖負荷試験における糖負荷後2時間までの血漿中インスリン濃度測定によるか、あるいは、代替法として主にインスリン抵抗性改善剤の投与の基準として用いられている、肥満の程度をあらわすBMI(Body Mass Index、日本の場合)、および、治療のために投与しているインスリン量(米国の場合)により、判断されている。インスリン抵抗性を早期に検出するという観点から考えると、これらの方法は、正確さ、感度、侵襲的であることなどの点で、満足できる方法ではない。したがって、これらの欠点を解消する簡便な診断方法が望まれている。

【0006】侵襲性の少ない糖尿病の診断方法として、尿中のD-キロイノシトールを測定する試みは、いくつかなされている。糖尿病患者の尿中のD-キロイノシトールの1日の排泄量が健常人の尿中の1日の排泄量よりも低いとする報告[New England Journal of Medicine, 323, 373 (1990)など]と、逆に糖尿病患者の尿中で高いとする報告[Proceedings National Academy of Science, U.S.A., 90, 9988 (1993)]があり、一定していない。また、前糖尿病状態の一つの形態と考えられる耐糖能不全(IGT, Impaired Glucose Tolerance)の被験者の尿中のD-キロイノシトールの1日の排泄量は健常人よりも有意に低いという報告がある[Diabetes Care, 17, 1465 (1994)]。尿中のキロイノシトールの測定による潜在的なインスリン作用抵抗性の診断方法(特表平4-505218号)、D-キロイノシトールの測定による糖尿病患者の検出方法(WO94/08044、日本特許2834321号)などがある。また体液中のミオイノシトール/キロイノシトール比によりインスリン耐性を検出する方法(特表平10-507826号)も知られている。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明者は、非侵襲的な方法により、前糖尿病状態を簡便に測定する方法を見出す目的で鋭意研究を行なった結果、糖負荷後一定時間の間の尿を採取し、尿中のD-キロイノシトールを定量しあらかじめ設定した基準値と比較することにより、該目的が達成されることを見出し、本発明を完成した。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、被験者に一定量の糖を投与した後、一定時間の間に被験者から採取した尿に含有されるD-キロイノシトールの濃度を定量し、あらかじめ、健常人および前糖尿病状態の人から同様の方法によって採取した尿について定量したD-キロイノシトールの濃度から作成した基準値と比較することにより、前糖尿病状態を検出する方法が提供される。さらに、本発明によれば、インスリン抵抗性、高インスリン血症、耐糖能不全などの前糖尿病状態から発症または進展する疾患、例えば、糖尿病、動脈硬化、高血圧、多囊胞性卵巣症候群などの疾患の予知法、診断法、

さらに、それら疾患を治療するための薬剤である前糖尿病状態改善剤などの薬物評価法が提供される。

【0009】本発明により診断あるいは予知できる疾患は、インスリン抵抗性、高インスリン血症、耐糖能不全などの前糖尿病状態を経て発症する疾患であれば、いかなる疾患をも包含する。最も好適な例として、糖尿病の予知(前糖尿病状態の診断)があげられるが、糖尿病・動脈硬化・高血圧・多囊胞性卵巣症候群などの診断にも応用される。

#### 10 【0010】

【発明の実施の形態】本発明における前糖尿病状態の検出は、被験者への糖負荷後一定時間後に尿中に排泄されるD-キロイノシトールの量または増加率をあらかじめ設定した基準値と比較して行われる。増加率は糖負荷後一定時間でのD-キロイノシトール量と糖負荷前のD-キロイノシトール量との比として算出される。

【0011】D-キロイノシトールの濃度は、実測値または、飲水などによる尿の希釈効果を補正するための適当な標準となる指標に対する相対値が使用される。指標としては、たとえば、糖負荷前の尿中のD-キロイノシトール濃度やそれぞれの尿サンプル中のクレアチニン濃度などが利用できる。本発明を実施する上での、糖の投与量および投与方法は、あらかじめ健常人の基準値と前糖尿病状態の人の値を定量して、十分な差が認められれば、いかなる量、いかなる方法であってもよいが、通常の糖負荷試験に用いられている75gグルコースの水溶液を経口投与する方法が好ましい。

【0012】尿を採取する時期は、糖を負荷した直後から5時間後までのいずれの時期であってもよく、蓄尿の期間は30分～2時間の間で適宜選択される。糖負荷後1時間から3時間までの任意の1時間の尿を採取することが好ましい。採取した尿中のD-キロイノシトールの定量方法としては、異性体を正しく区別して定量できる方法であれば、いかなる方法も用いられる。例えば、公知のガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーを用いる方法[New England Journal of Medicine, 323, 373 (1990)]、特異的抗体を用いる免疫学的方法(特開平8-21835号、特開平8-278304号)、カラムクロマトグラフィーを用いる方法、ペーパークロマトグラフィーを用いる方法、D-キロイノシトール特異的酵素を用いる酸化還元分析方法などが用いられる。

【0013】ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーを用いる方法(GC/MS)においては、正確な定量するために採取サンプルに種々の処理が施される。内部標準物質の添加は、以降の除蛋白、抽出、誘導体化などの前処理操作によるサンプルのロスを補正するために行われる。無水エタノール添加と遠心分離操作は除蛋白のために行われる。ウレアーゼ処理と除蛋白は、GC/MSが微量分析であるので尿中に多量に含まれる尿素と多量に含まれる可能性のある蛋白質を予め除くた

5

めに行われる。また蛋白質は、D-キロイノシトールの水酸基をトリメチルシリル化する際に定量的な反応を妨害する可能性があるので除く必要がある。D-キロイノシトールのトリメチルシリル化やアセチル化は、GC/MS分析において揮発性物質が要求するために必要である。トリメチルシリル化はN, O-ビストリメチルシリルトリフルオロアセトアミドとトリメチルクロロシランなどを用いて行われる。

**【0014】**本発明方法は、尿以外の体液例えば血液中のD-キロイノシトール測定結果の比較によっても行い得るが、血液採取は侵襲的方法となるため尿による検出方法が好ましい。

**【0015】**前糖尿病状態の判断となる基準値は、予め本発明の範囲内で設定した条件下において、複数の被験者（通常、正常者と前糖尿病状態者、それぞれ10名程度）について定量した値を比較することによって設定することができる。具体的には、例えば耐糖能不全の場合、75g糖負荷試験における糖負荷1時間後から2時間後の1時間の間の蓄尿について尿中のD-キロイノシトールを実施例1記載の方法で測定した場合、同じ尿サンプル中のクレアチニン排泄量1mgに対しD-キロイノシトール量3.0μgを基準値とすることができます。この基準値を超えた場合の被験者を前糖尿病状態として診断することができる。以下に前糖尿病状態判定の実例をあげる。

**【0016】**糖尿病ではない86人の被験者に75g糖負荷試験を行い、糖負荷後1時間から2時間の1時間の間の蓄尿を行った。その蓄尿について、尿中のD-キロイノシトールを実施例に記載の方法で定量し、実施例に記載した方法で尿中クレアチニン排泄量に対する尿中D-キロイノシトールの量を計算した。その結果、WHOの診断基準により耐糖能不全と診断された被験者14人のうち、11人が基準値を超える尿中クレアチニン排泄量に対する尿中D-キロイノシトール値を示した。また、WHOの診断基準により正常と診断された被験者72人の内、58人が基準値以下であった。WHOの診断基準により正常と診断された被験者72人の内、14人が基準値を超えていたが、その内の12人は、日本糖尿病学会の診断基準で境界型に分類された。その12人は、WHOの診断基準により正常と診断されたとはいえない、前糖尿病状態にあると考えられ、本発明の基準によって、より明確に診断できたといえる。

**【0017】**本発明によれば、前糖尿病状態と診断された動物に試験化合物を投与することにより、前糖尿病状態を改善する薬物例えはインスリン抵抗性改善薬を評価しスクリーニングすることができる。以下に、実施例によりさらに具体的に本発明を説明する。

**【0018】**

**【実施例】実施例1 尿サンプルの採取とD-キロイノシトールの分析例**

6

糖尿病ではない被験者35名に通常の75gグルコース経口糖負荷試験を施行する直前および糖負荷後0~1時間、1~2時間、2~3時間の4回に分けて蓄尿した。尿サンプル100μlに対して1mgのウレアーゼ（シグマ社、そら豆由来タイプII、31000単位/g）を加え、37℃で30分間保温した。保温が終了した尿サンプルに、n-ヘプタデカン酸(50nmol)を内部標準物質として含む無水エタノール0.9mlを添加し、十分混和した。エッペンドルフ遠心分離機で10分間遠心分離を行ない蛋白を除去した後、得られた上清をスクリューバイアル瓶に移し、30℃で減圧乾固した。100μlのN, O-ビストリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（和光純薬社製）と10μlのトリメチルクロロシラン（和光純薬社製）を加えて80℃で30分間反応させ、D-キロイノシトールをトリメチルシリル誘導体とした。該トリメチルシリル誘導体はQ.P.5000（島津製作所製）を用いるガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリーにて分析した。ガスクロマトグラフィー用キャピラリーカラムに流速1.47ml/minのヘリウムガスをキャリアーガスとして流して分析した。トリメチルシリル化したサンプル2μlを38:1の比のスプリットモードで注入し、60℃から350℃まで毎分17℃で昇温分析した。マススペクトルは電子衝撃法により、m/z 50からm/z 650まで0.4秒でスキャンする低分解能モードで行った。尿中のD-キロイノシトール量の増加率を糖負荷後2~3時間蓄尿中のD-キロイノシトール量/糖負荷前尿中のD-キロイノシトール量の比として計算した。

**【0019】実施例2 インスリン抵抗性の測定例**  
30 尿中D-キロイノシトール量がインスリン抵抗性の有無によって大きな差があることを示すために、上記の糖負荷試験の際に血液を採取し、血中インスリン濃度を測定した。即ち、糖負荷直前、糖負荷後30分、60分、90分、120分、180分に採血して、血中インスリン濃度を測定し、これらの値を用いて血中インスリン曲線下面積(AUCIRI0-180)を求めた。さらに、AUCIRI0-180が100μU·hr/ml未満およびそれ以上の2群に分けた。前者の群には18名、後者の群には17名が含まれた。

**【0020】(結果)** それぞれの群の尿中D-キロイノシトール量の増加率を比較した。結果を図1に示す。図中、U120-180/U0は、糖投与後2~3時間の間の1時間分の尿中D-キロイノシトール量の増加率をあらわす。インスリン抵抗性が存在し、高インスリン血症を呈している群(AUCIRI0-180≥100μU·hr/ml)の尿中D-キロイノシトール量の増加率は、インスリン抵抗性が存在しない、したがって、高インスリン血症を呈していない群(AUCIRI0-180<100μU·hr/ml)の尿中D-キロイノシトール量の増加率に比較して、顕著に高いことが認められる。この差は、糖

負荷後0~1時間、1~2時間、2~3時間に採取したいずれの尿サンプルにおいても認められ、中でも、糖負荷後2~3時間の尿サンプルを用いた場合が最も顕著であった。

#### 【0021】実施例3 耐糖能不全の測定例

前糖尿病状態の一つの形態である耐糖能不全の有無によって尿中D-キロイノシトール量に大きな差があることを次に示す。

【0022】糖尿病ではない被験者129名に75gグルコース経口糖負荷試験を施行し、上記の方法と同様にして、尿中のD-キロイノシトール量を測定した。また、同時に、糖負荷の直前、糖負荷後30分、60分、120分の血糖値を測定した。これらの血糖値を用いて、血糖曲線下面積(AUCBS)を算出し、AUCBS( $\text{mg} \cdot \text{hr} / \text{dl}$ )が275未満、275以上340未満、および340以上の3群に分けた。各群には、順に63名、40名、26名が含まれた。

【0023】(結果)各群の尿中のD-キロイノシトール量を比較した結果を図2に示した。図中、低AUCBS群、中AUCBS群、高AUCBS群は、それぞれ、AUCBS( $\text{mg} \cdot \text{hr} / \text{dl}$ )が275未満、275以上340未満、340以上をあらわし、CIは、尿中クレアチニン1mg当たりの尿中D-キロイノシトール量( $\mu\text{g}$ )を表す。

#### 【0024】AUCBSが高いことは、糖負荷後の血糖推

移が高く維持されていることを示し、すなわち、耐糖能不全があることを意味する。図2から明らかであるように、AUCBSが高いほど、つまり耐糖能不全の程度が悪いほど、尿中キロイノシトール量が著しく高い。

#### 【0025】

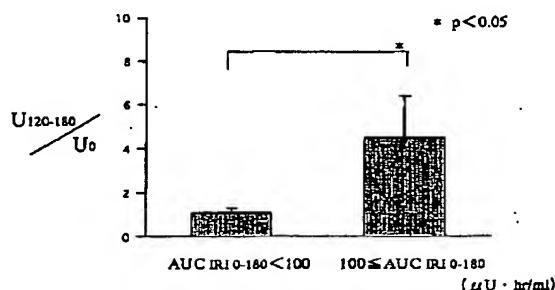
【発明の効果】本発明によれば、非侵襲的に糖尿病前段階を評価できる診断方法が提供される。また、この方法は、基準値をあらかじめ設定することによって、インスリン抵抗性、高インスリン血症、耐糖能不全に基づく疾患の予知方法・診断方法にも応用できる。さらに、本方法によって、前糖尿病状態改善剤などの治療薬の効果を評価することもできる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】糖負荷後採取尿中のD-キロイノシトール量の増加率を血中インスリン曲線下面積の差により分けて示した図である。図中、U<sub>120-180</sub>/U<sub>0</sub>は、糖投与後2~3時間の間の1時間分の尿中D-キロイノシトール量の増加率を表す。

【図2】糖負荷後採取尿中のD-キロイノシトール量を血糖曲線下面積(AUCBS)の差により分けて示した図である。図中、低AUCBS群、中AUCBS群、高AUCBS群は、それぞれ、AUCBS( $\text{mg} \cdot \text{hr} / \text{dl}$ )が275未満、275以上340未満、340以上を表し、CIは、尿中クレアチニン1mg当たりの尿中D-キロイノシトール量( $\mu\text{g}$ )を表す。

【図1】



【図2】

